

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Gießen

Direktoren: Prof. Dr. med. H.A. Kühn

Prof. Dr. med. H.G. Lasch

Prof. Dr. med. H.J. Dengler

Untersuchungen über die diagnostische Bedeutung
von
Auftrennungsmethoden der alkalischen Phosphatase

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

1969

vorgelegt von

Iris Wolff

aus

Sterbfritz /Krs. Schlüchtern

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Gießen

Direktoren: Prof. Dr. med. H.A. Kühn

Prof. Dr. med. H.G. Lasch

Prof. Dr. med. H.J. Dengler

Untersuchungen über die diagnostische Bedeutung

von

Auftrennungsmethoden der alkalischen Phosphatase

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

I r i s W o l f f

aus

Sterbfritz / Krs. Schlüchtern



Dekan: Prof. Dr. H. R e t t i g
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. W. W ö r n e r
Correferent: Prof. Dr. L. R ö k a
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 1969

Meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

- 1.0 Einleitung
- 2.0 Problemstellung
- 3.0 Material und Methode
- 3.1 Stärkegelelektrophorese
- 3.2 Hitzeinaktivierung bei 56°C
- 3.3 Hemmung mit L - Phenylalanin
- 3.4 Bestimmung der alkalischen Phosphatase
- 3.5 Statistische Berechnungen
- 3.51 χ^2 - Verfahren
- 3.52 Zwei-Faktorenplan
- 4.0 Ergebnisse
- 4.1 Stärkegelelektrophorese
- 4.11 Hepatobiliäre Erkrankungen
- 4.12 Knochenerkrankungen
- 4.111 Cholangitis - Cholangiolitis - Cholecystitis
- 4.112 Hepatitis - Lebercirrhose
- 4.113 Verschlußikterus durch Stein, Tumor oder Striktur
- 4.2 Hitzeinaktivierung
- 4.21 Hepatobiliäre Erkrankungen
- 4.22 Knochenerkrankungen
- 4.23 Galleflüssigkeit
- 4.24 Serum von gesunden Vergleichspersonen
- 4.3 Hemmung mit L - Phenylalanin
- 5.0 Diskussion

- 5.1 Stärkegelelektrophorese
- 5.2 Hitzeinaktivierung
- 5.3 Hemmung mit L - Phenylalanin
- 6.0 Zusammenfassung
- 7.0 Literatur

1.0 Einleitung

Die alkalische Phosphatase (AP) zählt zu den am längsten bekannten Enzymen. 1907 wurde erstmals von SUZUKI, YOSHIMURA und TAKAISHI ein Enzym " PHYTASE" beschrieben, das die Anhydroxymethylen - diphosphorsäure spaltet.

Der Begriff alkalische Phosphatase wurde für eine Gruppe von Enzymen gewählt, die Phosphatester in einem alkalischen Milieu (pH um 9,0) hydrolisieren.

Obwohl die alkalische Phosphatase nun schon über fünfzig Jahre bekannt ist und ihre Bestimmung im menschlichen Serum ein wichtiger Bestandteil der Laboruntersuchungen geworden ist, gibt es bezüglich dieses Enzymes noch viele Unklarheiten. So ist z.B. das natürliche Substrat der alkalischen Phosphatase nicht bekannt. Auch kann mit dem selben Substrat, z.B. α - Naphthylphosphat, eine Enzymaktivität mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Die alkalische Phosphatase befindet sich intrazellulär z.B. in den Membranen der proximalen Tubuluszellen der Niere, in den Membranen der Schleimhautepithelzellen des Darms oder in den Zellwänden von E.coli. Diese Lokalisation legte die Vermutung nahe, daß eine Beziehung zwischen den alkalischen Phosphatasen und dem Transport des Phosphates durch die Zellwände besteht (POSEN 1967).

Extrazellulär konnte die alkalische Phosphatase in der Milch, in der Lymphe, in der Galle und im Plasma gefunden werden. Die hepat. AP des Serums wird wahr-

scheinlich an den sinusalen Grenzflächen der Leberzellen gebildet, die Gallenphosphatasen wahrscheinlich in den der Gallenkapillaren zugewandten Leberzellenmembranen (HILL und SAMMONS 1967).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß Enzyme gleicher Wirkung nicht immer die gleiche Struktur besitzen. Durch die Einführung elektrophoretischer Trennmethode, die es ermöglichten, Enzyme hinsichtlich ihrer Proteinstruktur besser zu unterscheiden, konnte die alkalische Phosphatase in verschiedene Komponenten zerlegt werden.

Die alkalische Phosphatase gehört in die Gruppe der heterogenen Enzyme. Nach WIELAND und PFLEIDERER (1962, 1963) sind differente Enzyme oder Heterozyyme physikalisch oder biochemisch unterscheidbare Enzyme gleicher biologischer Wirkung aber verschiedener Herkunft.

AEBI und RICHTERICH (1963) unterscheiden vier Typen von heterogenen Enzymen:

1. Isodyname Enzyme (z.B. Phosphatasen, Esterasen)
2. Zellspezifische Enzyme (z. B. Muskelphosphorylase, Leberphosphorylase)
3. Organellenspezifische Enzyme (z.B. Glutamat-Oxalat- Transaminase, Malatdehydrogenase)
4. Isoenzyme (z.B. LDH, Kreatinkinase)

Von einigen Autoren wird die alkalische Phosphatase als Isoenzym bezeichnet. Unter Isoenzymen werden jedoch lediglich die multiplen Enzymformen verstanden, die in

einem Organ in mehreren Komponenten vorkommen und die von WIELAND und PLEIDERER geforderten drei Kriterien besitzen. Anhand dieser drei Kriterien für Isoenzyme:

1. Unterschied der Primärstruktur bei gleichem Molekulargewicht
2. Deutliche biochemische Unterschiede
3. Unterschiede in der Verteilung in Geweben und Organen

sind bisher lediglich die Laktatdehydrogenase und die Kreatinkinase als Isoenzyme zu bezeichnen.

Die alkalische Phosphatase bezeichnet man somit besser als isodynames Enzym.

Die alkalische Phosphatase wurde mit verschiedenen Methoden in einzelne Komponenten getrennt. Anzahl und Lokalisierung dieser Fraktionen verhielten sich je nach der angewandten Technik verschieden.

ESTBORN (1964), BOYER (1961), CHIANDUSSI (1962), TASWELL und JEFFERS (1963) trennten in der Stärkegelelektrophorese Serum von Leber- und Knochenkranken, Galle und Placentaextrakte auf. Als Substrat benutzten sie α -Naphthylphosphat.

MOSS und KING (1962) untersuchten ebenfalls im Stärkegel, jedoch mit β -Naphthylphosphat als Substrat.

HAIJE und De JONG (1963) haben Serum von Patienten mit Knochen- und hepatobiliären Erkrankungen in der

Agargelelektrophorese aufgetrennt und die AP-Aktivität mit β -Glycerophosphat als Substrat dargestellt.

DUNNE, PENNELLY, Mc GEENEY (1967) versuchten die alkalischen Phosphatasen nach dem Molekulargewicht mit Sephadex 200 (Gelfiltration) aufzutrennen.

Als Trägermaterial wurden außerdem Zelluloseacetatfolien, Papier, Stärkeblock u.a. und als Substrat p-Nitrophenylphosphat, Phenylphosphat und Phenolphthaleinphosphat verwendet.

2.0 Problemstellung

Die bis jetzt in der Literatur angegebenen Ergebnisse von der Auftrennung und Differenzierung der alkalischen Phosphatase und insbesondere deren klinische Bedeutung sind nicht einheitlich. Während ein Teil der Autoren glaubt, mittels der hochspannungselektrophoretischen Trennung eine Organherkunft, d.h. insbesondere eine Unterscheidung zwischen Knochen- und Leberphosphatase, feststellen zu können (W.G. HAIJE und M. De JONG; TASWELL und JEFFERS; B. NOR-KEIDING (1962), DENTOFT - JENSEN (1964); M.A. NEWTON (1967); HODSON, LATNER und RAINE), wird dies von anderen Autoren bezweifelt, da sie bei hohen Knochenphosphatasewerten ein ähnliches Muster wie bei Lebererkrankungen fanden (CHIANDUSSI, GREEN und SHERLOCK; R. KOTZAUREK und SCHOBEL (1963); BOYER; MOSS und KING).

Außerdem schien uns die Anwendung anderer, nur von wenigen Autoren benutzter Methoden, für die klinische Diagnostik bedeutungsvoll (Hitzeinaktivierung nach POSEN, Hemmung mit L - Phenylalanin).

Wir haben daher folgende drei Methoden, die hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussage besonders erfolgreich zu sein versprochen, ausgesucht und bei Leber- und Knochenerkrankungen angewandt:

I. Stärkegelelektrophorese

Mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese sollten die alkalischen Phosphatasen in einzelne Enzymkomponenten aufgetrennt werden. Es sollte geprüft werden, ob aus dem Verteilungsmuster der Aktivitätszonen Rückschlüsse auf die Art der Erkrankung möglich sind.

II. Hitzeinaktivierung bei 56°C

(nach POSEN, NEALE und CLUBB (1965))

Die Hitzeinaktivierung sollte zeigen, ob ein unterschiedlicher Aktivitätsverlust einen Hinweis auf die Art der Erkrankung zulässt.

III. Hemmung mit L-Phenylalanin

Mit Hilfe der Hemmung sollte geprüft werden, ob mittels L-Phenylalanin die einzelnen Komponenten verschieden stark gehemmt werden und so eine Unterscheidung möglich ist.

Im Gegensatz zu anderen Autoren, die lediglich eine optische Auswertung der einzelnen Aktivitätszonen durchführten, schien es uns wichtig, die Aktivität der einzelnen Komponenten zu messen und diese miteinander in Beziehung zu setzen.

3.0 Material und Methode

Für die Untersuchungen standen z.T. frische, z.T. eingefrorene, nicht hämolytische Seren von 140 Patienten mit verschiedenen Skelet- und hepatobiliären Erkrankungen zur Verfügung. Zum Vergleich wurden außerdem Seren von Gesunden herangezogen.

Die Diagnosen wurden klinisch, laborchemisch und radiologisch ermittelt und in einigen Fällen durch Biopsie und Autopsie bestätigt.

3.1 Stärkegelelektrophorese

Die Auftrennung der alkalischen Phosphatasen erfolgte hochspannungselektrophoretisch im Stärkegel.

Nach mehrfachen Vorversuchen kamen wir, ausgehend von der Anweisung nach SMITHIES (1955), zu folgender Stärkegelzusammensetzung:

25 g Kartoffelstärke (E. Merck)

35 g lösliche Stärke (E. Merck)

300 ml Boratpuffer (Kochpuffer) pH 8,6

Zusammensetzung des Boratkochpuffers:

1,86 g H_3BO_4

0,48 g NaOH

auf 2000 ml aqua dest. auffüllen

Als Elektrophoresegerät diente der Pherograph "Original Frankfurt" der Firma L. Hormuth, Wiesloch. Das Gerät besitzt zwei gekühlte Kammern, auf denen jeweils zwei Gelschalen gleichzeitig aufgetragen werden können. Als Puffer diente NaOH-Borsäure-Puffer (Brückenpuffer) pH 8,6.

Zusammensetzung des Boratbrückenpuffers:

18,60 g Borsäure

2,40 g NaOH

auf 2000 ml aqua dest. auffüllen

Ausführung:

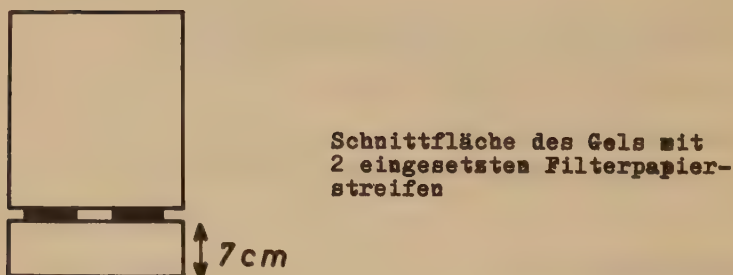
Kartoffelstärke und lösliche Stärke werden mit Boratpuffer in einem 500 ml Rundkolben gelöst und unter ständigem leichtem Schwenken über einer Bunsenbrennerflamme so lange erhitzt, bis die Stärke zähflüssig und durchsichtig erscheint. Die sich hierbei bildenden Luftblasen werden anschließend mittels eines Reitmayeraufsatzes an der Wasserstrahlpumpe abgezogen.

Das heiße Gel wird dann sofort in eine mit Paraffinöl eingeriebene Gelschale ausgegossen. (Die Gelschale ist eine 30 cm lange, 8cm breite und 0,6 cm tiefe Kunststoffschale).

Das Gel läßt man erkalten und stellt es dann 4 - 5 Stunden in einen Kühlschrank bei etwa 4°C. Von der nun festgewordenen Gelplatte schneidet man mit einem Skalpell oder Messer einen 6 - 7 cm breiten Gelstreifen

ab und setzt zwischen die beiden so entstehenden Schnittflächen zwei mit Serum getränkte Filterpapierstreifen ein.

Abb. 1



Die Gelplatte wird mit erhitztem Paraffin (Erstarrungspunkt $42 - 44^{\circ}\text{C}$) übergossen, um ein Austrocknen des Gels während des elektrophoretischen Vorganges zu verhindern. Nach dem Erstarren werden von beiden Seiten der Paraffinschicht etwa 5 cm breite Streifen abgetrennt, an deren Stelle später die Elektroden der Hochspannungselektrophorese aufliegen.

Die Elektrodenschalen der Hochspannungselektrophorese werden mit Boratbrückenpuffer gefüllt. Bevor die Gelzellen eingesetzt werden, stellt man in dem Elektrophoresegerät die Kühlung auf eine Temperatur von -6 bis -7°C ein. Nun wird die Gelschale so in die Elektrophorese eingebracht, daß an der den Filterpapierstreifen am nächsten liegenden Seiten die Kathode und an der entgegengesetzten Seite die Anode angelegt wird.

Die Trennung erfolgt bei etwa 800 Volt/cm und 20 Milli-Ampère.

Abb. 2



Nach etwa 14 Stunden sind die Komponenten der alkalischen Phosphatasen deutlich voneinander getrennt. Die Gelplatte wird herausgenommen und mit einem Draht oder dünnen Messer so durchschnitten, daß zwei Gelplatten von etwa 3 mm Dicke entstehen.

Färbung:

I. Darstellung der durch die elektrophoretische Auftrennung gewonnenen Aktivitätsbänder der alkalischen Phosphatasen. Die alkalischen Phosphatasen werden im Stärkegel mit Na- α -Naphthylphosphat als Substrat und Variaminblausalz B als Farbstoff nachgewiesen.

Nach der Elektrophorese werden die Gelplatten sofort in folgende Lösung eingebracht:

50 ml 0,1 M Tris - HCL Puffer pH 9,0

15 mg Na- α -Naphthylphosphat

30 mg $MgSO_4$

30 mg Variaminblausalz B

(Variaminblausalz B löst man vorher in etwa 1 ml

Äthylenglykol)

Die Farblösung wird anschließend filtriert.

Nach 3 - 5 Stunden nimmt man die Gelplatten aus der Lösung und wäscht sie mit Aqua dest. aus.

Die Extinktion der einzelnen Banden wird photometrisch im "VITATRON" Spektrometer bei 405 m μ gemessen.

II. Zur Darstellung der Serumproteine wird mit Amido-Schwarz 10 B gefärbt.

Man gibt die Gele in folgende Lösung:

400 ml Methanol

100 ml Eisessig

50 ml Aqua dest.

wobei man soviel Amido - Schwarz 10 B hinzugibt, bis eine gesättigte Lösung entsteht.

Nach 2 - 3 Stunden werden die Gele aus der Lösung genommen und entfärbt.

Zusammensetzung des Entfärbers:

400 ml Methanol

100 ml Eisessig

500 ml Aqua dest.

3.2 Hitzeinaktivierung bei 56°C

(nach POSEN, NEALE und CLUBB)

Bei der Hitzeinaktivierung wurde von jedem der zu untersuchenden Seren und Galleflüssigkeiten zunächst die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt. Anschließend inkubiert man die Serumproben, und zwar jeweils drei Proben von einem Patienten in einem Wasserbad von 56°C. Nach 10 Minuten, 15 Minuten und 30 Minuten werden die einzelnen Proben dem Wasserbad entnommen und sofort in ein Eisbad gegeben. Danach wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den inaktivierten Seren bestimmt.

3.3 Hemmung mit L - Phenylalanin

Bei den Hemmuntersuchungen werden die Pherogramme nach der elektrophoretischen Auftrennung und photometrischen Bestimmung der einzelnen Aktivitätsbanden in 0,005 M L-Phenylalanin inkubiert. Danach wird die Farbintensität der einzelnen Banden nochmals photometrisch bestimmt.

Zusammensetzung der Lösung:

50 ml 0,1 M Tris - HCL Puffer pH 9,0

30 mg $MgSO_4$

30 mg Na'- α -Naphthylphosphat

30 mg Variaminblausalz B

52,9 mg 0,005 M L - Phenylalanin

3.4 Bestimmung der alkal. Phosphataseaktivität im Serum

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum wurde nach der Methode von BESSY, LOWRY und BROCK mit den Reagentien von BOEHRINGER (Mannheim) ausgeführt.

Ausführung:

In ein Reagensglas werden 0,1 ml Serum und 1 ml Substratlösung, die aus 0,05 M Glycin-Puffer, 0,0005 M $MgCl_2$, 0,0055 M Na - p - nitrophenylphosphat besteht, pipettiert und zusammen mit dem Leerwert, der 1 ml Substratlösung enthält, im Wasserbad bei 37°C 30 min lang inkubiert.

Danach werden der Probe 10 ml NaOH, dem Leerwert 0,1 ml Serum und 10 ml NaOH zugegeben.

Nun wird die Extinktion der Probe im Photometer Eppendorf (Firma Netheler & Hinz, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 405 nm in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke gegen den Leerwert gemessen.

Bei den zu untersuchenden Seren lagen die Werte der alkalischen Phosphatasen in einem Bereich von 6,5 - 70 mME. (Normalbereich 2 - 5 mME)

3.5 Statistische Berechnungen

Alle Ergebnisse wurden statistisch gesichert. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach:

3.5.1 χ^2 - VERFAHREN

(LIENERT, G.A. (1962)

3.5.2 VARIANZANALYSE: 2 - Faktorenplan (p x q)

mit wiederholten Messungen auf Faktor B (q)

und n Replikationen. (B.J. WINER, 1962).

Da die zu untersuchenden Ausgangswerte ein Verhältnis darstellten, wurden die Werte zunächst transformiert (B.J. WINER, 1962).

Durch die Transformation kommt es zur Stabilisierung der Varianz und die Additivität der zu untersuchenden Effekte wird dadurch besser angenähert.

Die Standardabweichung oder die mittlere quadratische Abweichung wurde nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{sx^2 - \frac{(sx)^2}{N}}{N-1}}$$

berechnet, wobei folgende Abkürzungen benutzt wurden

x = Einzelwert

N = Zahl der Einzelwerte

s = Summe

Berechnung des Variationskoeffizienten nach der Formel:

$$V = \frac{s}{x}$$

Herrn Dr. Beckmann, Diplompsychologe, danke ich für die freundliche Beratung bei den statistischen Berechnungen.

3.51 χ^2 - VERFAHREN

Die Unabhängigkeit zweier Stichproben kann in einer Tafel mit 2 Zeilen und 2 Spalten geprüft werden. Für diese Vierfeldertafel werden die Häufigkeiten dem nachstehenden Schema entsprechend bezeichnet:

VIERFELDERTAFEL

	MITTELWERT d.Stichproben I u.II		Summe
	oberhalb d.M.	unterhalb d.M.	
I. Stichprobe	a	b	a + b
II. Stichprobe	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	n

Aus der Gesamtheit der Einzelwerte der Stichproben I u. II wird der Mittelwert errechnet. Alle Einzelwerte der Stichprobe I, die oberhalb des Mittelwertes liegen werden in das Feld a, alle die unterhalb des Mittelwertes liegen in das Feld b der Vierfeldertafel eingesetzt. Ebenso werden alle Einzelwerte der Stichprobe II, die oberhalb des Mittelwertes liegen, in das Feld c, die unterhalb des Mittelwertes liegen, in das Feld d eingetragen. Das Signifikanzniveau p wird nach der Formel

$$\chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

berechnet.

Quelle	df	E (MS)
AB	$(p - 1)(q - 1)$	$\sigma_{\varepsilon}^2 + \sigma_{\beta\bar{n}}^2 + n\sigma_{\alpha\beta}^2$
BxPat. in d.Gr.	$p(n - 1)(q - 1)$	$\sigma_{\varepsilon}^2 + \sigma_{\beta\bar{n}}^2$

A : p = 2 Stufen (i = 1, 2)

B : q = 3 Stufen (j = 1, 2, 3)

ANORDNUNG DER MESSWERTE:

	b ₁	b ₂	b ₃
a ₁	1 ⋮ 10	x _{1,1,1} ⋮ x _{1,2,1}	x _{1,3,1} ⋮ x _{1,3,10}
a ₂	11 ⋮ 20	x _{2,1,11} ⋮ x _{2,2,11}	x _{2,3,11} ⋮ x _{2,3,20}

B ist abhängig von der Zeit, deshalb wird gegen die Interaktion B x Pat. in der Gruppe getestet (F - Test)

AB ₁ 1	AB ₁ 2	AB ₁ 3	A ₁
AB ₂ 1	AB ₂ 2	AB ₂ 3	A ₂
B 1	B 2	B 3	T

T = Summe aller Werte

RECHENWEG:

1. = T^2 / npq

2. = $\sum x^2$

3. = $(\sum A_i^2) / nq$

4. = $(\sum B_j^2) / np$

5. = $(\sum (AB_{ij})^2) / n$

6. = $(\sum P_k^2) / q$

Quelle	Rechenformeln	SS		MS	F	p
1. Zw. den Pat.	(6) - (1)		(q - 1)			
2. A (z.B. Leber-S)	(3) - (1)		(p - 1)		*	
3. Pat. innerhalb der Gruppe	(6) - (3)		p(n - 1)			
4. Innerh. d. Pat.	(2) - (6)		np(q-1)			
5. B (Zeit)	(4) - (1)		(q - 1)		**	
6. AB	(5) - (3) - (4) + (1)		(p-1)(q-1)		***	
7. B x Pat. innerh.	(2) - (5) - (6) + (3)		p(n-1)(q-1)			

df = Freiheitsgrad (n - 1)

MS = Mittlere Summe der Quadrate

SS = Summe der Quadrate

F = F-Test (Wahrscheinlichkeitsausdruck)

p = Signifikanzniveau (Effekt / Error)

4.0 ERGEBNISSE

4.1 STÄRKEGELELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Auftrennung der alkalischen Phosphatasen im Stärkegel wurden mit Seren von insgesamt 110 Patienten durchgeführt. Die Auswertung der Pherogramme erfolgte in 74 Fällen mittels des Photometers "VITATRON", in 36 Fällen erfolgte lediglich eine optische Auswertung hinsichtlich Anzahl der Banden und Intensität der Anfärbung.

Das Gesamtkollektiv konnte zunächst in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

4.11 Hepatobiliäre Erkrankungen

4.12 Knochenerkrankungen

Die Gruppe der hepatobiliären Erkrankungen wurde in weitere drei Untergruppen unterteilt:

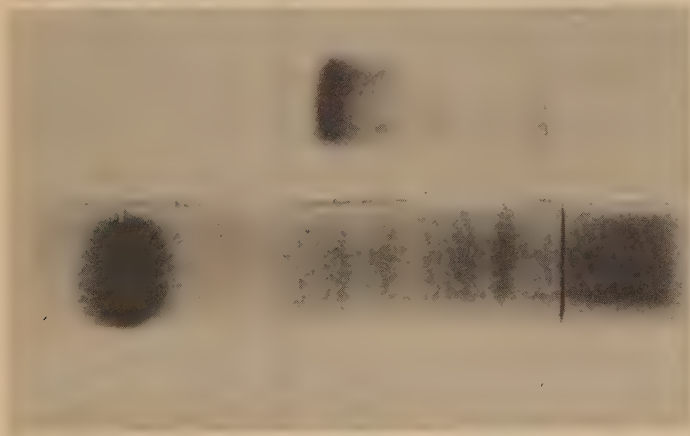
4.111 Cholangitis - Cholangiolitis - Cholecystitis

4.112 Hepatitis - Lebercirrhose

4.113 Verschlusßikterus durch Stein,
Tumor oder Striktur

Nach der elektrophoretischen Auftrennung fanden sich sowohl bei den Seren der Gruppe A als auch bei den Seren der Gruppe B bis zu drei sichere Fraktionen. Die einzelnen Banden unterschieden sich hinsichtlich der AP - Aktivität und der Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 4). Die höchste Aktivität der alkalischen Phosphatasen fand sich im β - Globulinbereich. Zwei schwächere Aktivitätsmaxima lagen im Bereich der β -Lipoproteine und zwischen den β - und γ -Globulinen (Abb.3).

Abb. 3: Hochspannungselektrophoretische Auftrennung von alkal. Phosphatase mittels der Stärkegelelektrophorese; daneben zum Vergleich eine Anfärbung der Serumeiweißkörper mit Amidoschwarz.



Nach den Empfehlungen des "Subcommittee on Isoenzymes" der "International Union of Biochemistry" (1964) wird die schnellste Bande, d.h. die am weitesten anodwärts wandernde Komponente mit I, die Aktivitätszone

mit mittlerer Wanderungsgeschwindigkeit mit II und die an der Auftragstelle befindliche Fraktion mit III bezeichnet.

Abb. 4: Verteilung der alkalischen Phosphatase-aktivität nach der elektrophoretischen Auftrennung im Stärkegel

Material	Zahl der Patienten	Komponenten		
		I	II	III
Normal - Serum	10			
Cholangitis	10	■		■
Cholangiolitis				
Cholecystitis	13	■		■
Cholelithiasis				
Akute Hepatitis	8	■	■	
	9	■	■	
Chron. Hepatitis	5	■	■	
	2	■	■	
Lebercirrhose	6	■	■	
	5	■	■	
	2		■	
	1		■	
Verschlusßsyndrom				
Stein :	5	■		■
Tumor :				
von außerhalb	4	■		■
Metastaseleber	7	■	■	■
	10	■	■	
Primärtumor d. Lunge	3	■	■	■
Knochen - Erkrankungen	7	■		
	3	■		

4.111 CHOLANGITIS - CHOLANGIOLITIS - CHOLECYSTITIS

Zur Untersuchung gelangte Serum von 23 Patienten, die an Cholangitis, Cholangiolitis und Cholecystitis mit Cholostase erkrankt waren.

Die Bilirubinwerte lagen in einem Bereich von 1,36 mg% bis 11,4 mg%. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und die Kupferwerte waren mäßig bis stark erhöht. Die Transaminasen Glutamat - Oxalat - Transaminase (GOT) und Glutamat - Pyruvat - Transaminase (GPT) lagen im Bereich der Norm oder zeigten einen nur geringen Anstieg. Die Werte der alkal. Phosphatasen schwankten zwischen 7,0 - 31,8 mME.

Nach der elektrophoretischen Trennung konnten insgesamt zwei oder drei anodenwärts wandernde Fraktionen mit unterschiedlicher Phosphataseaktivität nachgewiesen werden.

Bei 10 Patienten fanden sich eine schnell wandernde breite (I) und eine an der Auftragstelle befindliche Phosphatasefraktion (III) mit mittlerer Phosphataseaktivität.

Bei 13 Patienten konnten drei Komponenten nachgewiesen werden, wobei die 2. Phosphatasefraktion (II) die geringste Aktivität aufwies.

Die Extinktion der Banden wurde mit dem Photometer "VITATRON" bestimmt. Dabei entfielen im Mittel 74,34% des Ausgangswertes der AP - Aktivität auf die Bande I, 3,4% auf die Bande II und 20,13% auf die Bande III.

Tabelle Nr. 1

CHOLANGITIS - CHOLANGIOLITIS - CHOLECYSTITIS

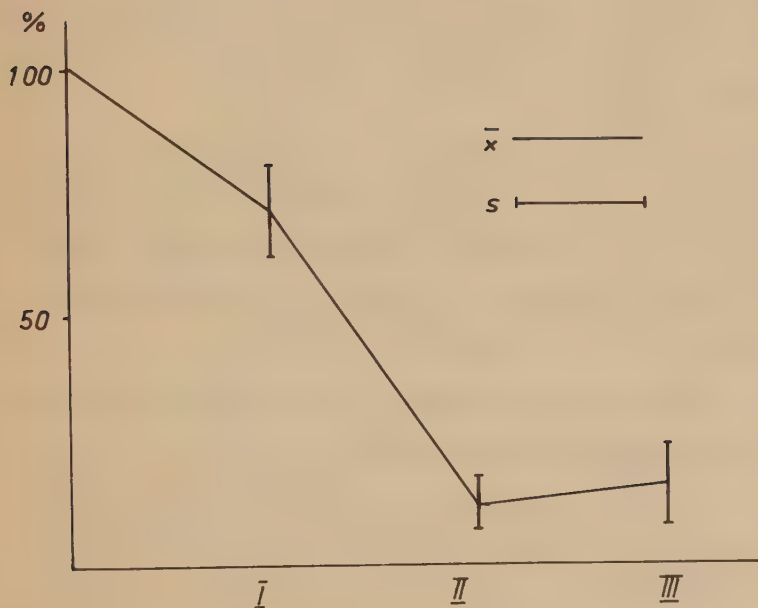
Diagnose	AP mME	I	II	III
1. Cholangitis	21,0	79,0 %	0,7 %	14,0 %
2. Cholangitis Cholelithiasis	10,2	77,0 %	1,0 %	13,0 %
3. Cholangitis Cholangiolitis	22,0	71,0 %	12,0 %	18,0 %
4. Cholangitis	7,3	69,0 %	0,9 %	22,0 %
5. Cholelithiasis	27,1	76,0 %	0,9 %	15,0 %
6. Chr. Cholangitis Fettleber	26,0	62,0 %	15,0 %	20,0 %
7. Cholelithiasis	7,3	67,0 %	0,1 %	33,0 %
8. Rez. Cholangitis	31,8	93,0 %	0,1 %	7,0 %
9. "	24,0	85,0 %	0,1 %	15,0 %
10. "	27,0	72,0 %	11,0 %	15,0 %
11. Cholangitis	14,4	59,0 %	12,0 %	29,0 %
12. Cholecysto-Chole- docholithiasis	25,3	84,0 %	0,1 %	15,0 %
13. Cholangitis	25,3	76,0 %	8,0 %	16,0 %
14. Cholangitis	15,0	70,0 %	9,0 %	20,0 %
15. Akute Cholangitis mit Cystikusver- schluß	7,2	78,0 %	-	20,0 %
16. Cholangitis	10,8	72,2 %	2,0 %	17,0 %
17. Cholangitis Cholelithiasis	11,7	75,0 %	-	21,0 %
18. Cholangitis	19,5	80,0 %	-	18,0 %
19. Cholangitis bei Cholelithiasis	7,0	77,0 %	3,0 %	18,0 %
20. Chr. Cholangitis	7,9	79,0 %	-	20,0 %
21. Cholangitis Cholecystitis	7,6	68,0 %	5,0 %	22,0 %
22. Cholangitis	9,12	73,0 %	-	24,0 %
23. Cholelithiasis	7,3	67,0 %	-	33,0 %

Tabelle Nr. 2

Verteilung der Phosphataseaktivität
auf die einzelnen Enzymfraktionen (I, II, III)

Komponenten	I	II	III
Zahl der Pat.	23		
Mittelwert $\bar{x}$	74,34	3,40	20,13
Standardabweichung s	7,60	5,90	2,28
Variationskoeff.	10	17,3	11

Abb. 5



4.112 HEPATITIS - LEBERCIRRHÖSE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der alkalischen Phosphatase standen Seren von 23 Patienten zur Verfügung.

Die Serumproben stammten von:

- 9 Patienten mit akuter Hepatitis
- 4 Patienten mit chron. Hepatitis
- 10 Patienten mit Lebercirrhose

Bei allen Patienten waren die Transaminasen, die Bilirubinwerte und die Serumlabilitätsproben pathologisch verändert. Die Werte der alkalischen Phosphatasen schwankten zwischen 6,0 und 21,8 mME.

In den 23 untersuchten Seren konnten zwei oder drei anodwärts wandernde Fraktionen nachgewiesen werden, die unterschiedliche Phosphataseaktivität zeigten.

Bei 8 Patienten fanden sich eine schnell wandernde Aktivitätszone I und eine Bande mit mittlerer Wanderungsgeschwindigkeit II.

Bei 15 Patienten konnten drei Aktivitätszonen nachgewiesen werden, wobei die Enzymfraktion an der Auftragsstelle III die geringste Phosphataseaktivität aufwies. In 2 Fällen zeigte die II. Fraktion eine höhere Enzymaktivität als die I. Fraktion.

In 7 Fällen wiesen die Banden I und II annähernd gleich hohe Phosphataseaktivitäten auf.

Bei einem Fall trat nur eine Zone mit mittlerer Wanderungsgeschwindigkeit auf, sie zeigte eine sehr hohe Enzymaktivität.

Tabelle Nr. 3HEPATITIS - LEBERCIRRHOSE

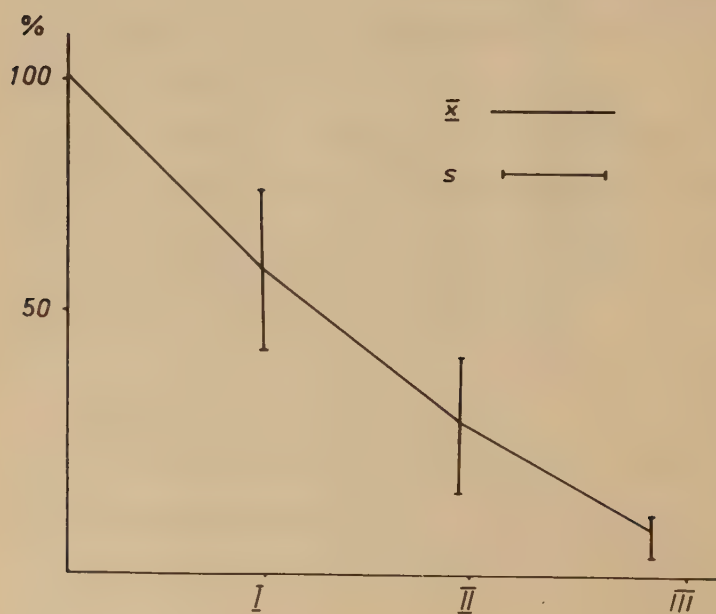
Diagnose	AP m ME	I	II	III
1. Akute Hepatitis	8,15	48,0 %	40,0 %	12,0 %
2. " "	7,9	54,0 %	46,0 %	0,0 %
3. " "	5,4	55,0 %	31,0 %	14,0 %
4. " "	19,2	65,0 %	30,0 %	5,0 %
5. " "	7,8	73,0 %	27,0 %	0,0 %
6. " "	6,7	74,0 %	25,0 %	0,0 %
7. " "	7,2	74,0 %	26,0 %	0,0 %
8. " "	7,0	60,0 %	36,0 %	4,0 %
9. " "	7,5	77,0 %	13,0 %	10,0 %
10. Chr. Hepatitis	12,3	47,0 %	27,0 %	23,0 %
11. " "	10,7	55,0 %	42,0 %	0,0 %
12. " "	9,9	70,0 %	25,0 %	5,0 %
13. " "	21,8	68,0 %	17,0 %	15,0 %
14. Lebercirrhose	8,3	84,0 %	16,0 %	0,0 %
15. " "	18,36	79,0 %	19,0 %	2,0 %
16. " "	10,2	57,0 %	26,0 %	17,0 %
17. " "	12,1	54,0 %	37,0 %	9,0 %
18. " "	8,6	21,0 %	79,0 %	0,0 %
19. " "	6,0	31,0 %	55,0 %	13,0 %
20. " "	10,0	84,6 %	11,6 %	3,8 %
21. " "	6,64	77,0 %	22,0 %	0,0 %
22. " "	12,0	50,0 %	35,0 %	15,0 %
23. " "	10,9	58,0 %	33,0 %	9,0 %

Tabelle Nr. 4

Verteilung der Phosphataseaktivität auf die
einzelnen Enzymfraktionen (I, II, III)

Komponenten	I	II	III
Zahl der Pat.	23		
Mittelwert $\bar{x}$	61,63	31,28	8,30
Standardabweichung s	16,15	14,94	4,56
Variationskoeff.	26	48	55

Abb. 6



4.113 VERSCHLUSSYNDROM durch STEIN, STRIKTUR oder TUMOR

Zur Untersuchung gelangte Serum von 16 Patienten mit erhöhter alkalischer Serumphosphatase. Die Ursache für die Erhöhung des Phosphatasespiegels waren:

Lebermetastasen bei 8 Patienten

Prim. Lebercarcinom bei 2 Patienten

Extrahep. Verschuß bei 5 Patienten
(durch Stein, Striktur, Pankreas-Ca)

Die Phosphatasewerte schwankten zwischen 7,3 und 62,4 mME.

Nach der elektrophoretischen Trennung konnten insgesamt zwei oder drei AP - Maxima, die sich hinsichtlich ihrer Enzymaktivität unterschieden, beobachtet werden.

Im Serum der Patienten mit Lebermetastasen und primärem Lebercarcinom fanden sich immer drei Aktivitätszonen. Die am schnellsten anodenwärts wandernde Bande (I) wies die höchste Aktivität auf. Die Zonen mit der mittleren und der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit zeigten annähernd gleich hohe Phosphataseaktivität.

Im Serum der Patienten mit extrahepatischem Verschuß konnten in zwei Fällen zwei Zonen nachgewiesen werden; eine Bande mit schneller Wanderungsgeschwindigkeit und hoher Enzymaktivität und eine Bande an der Auftragstelle mit mittlerer Phosphataseaktivität. In drei Fällen waren drei Komponenten vorhanden, wobei die mittlere die geringste Aktivität zeigte.

Bei einem Patienten mit Stauungsleber fanden sich drei Enzymfraktionen, wobei die I. am stärksten und die III. am schwächsten ausgeprägt war.

Tabelle Nr. 5VERSCHLUSS DURCH STEIN, TUMOR ODER STRIKTUR

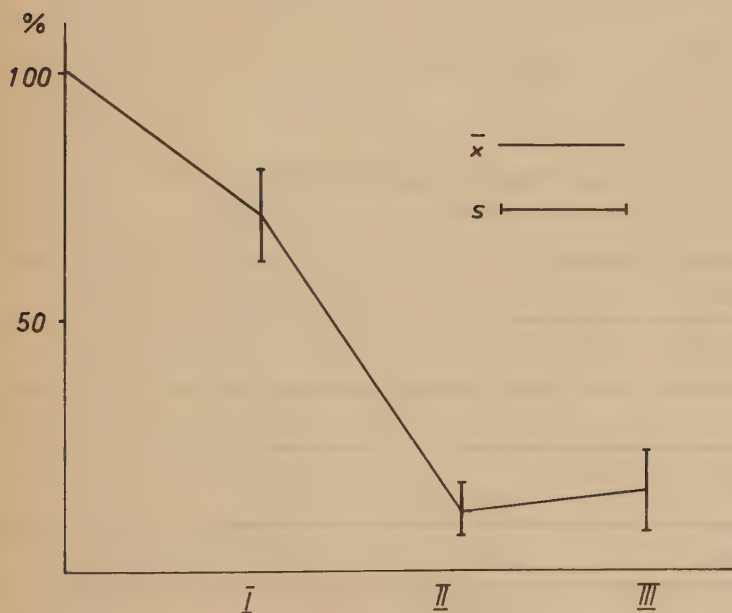
Diagnose	AP mME	I	II	III
1. Verschluß durch Papillenstein	9,21	73,0 %	0,0 %	27,0 %
2. extrahep. Verschl. Primtu.d. L.	8,95	64,0 %	15,0 %	21,0 %
3. M. Hodgkin	40,0	47,0 %	15,0 %	21,0 %
4. Metastasenl.	16,9	64,0 %	12,0 %	24,0 %
5. Verschl. bei Pankreas-Ca	7,6	77,0 %	9,0 %	14,0 %
6. Metastasenl.	25,9	75,0 %	13,0 %	12,0 %
7. "	9,3	65,0 %	20,0 %	15,0 %
8. "	10,1	66,0%	17,0 %	17,0 %
9. "	13,9	66,0 %	15,0 %	19,0 %
10.Prim. Leber-Ca	7,3	67,0 %	15,0%	17,0 %
11. Verschl. durch Malignom	21,8	76,0 %	18,0 %	6,0 %
12. Verschluß durch Striktur	25,0	79,0 %	15,0 %	16,0 %
13. Verschluß durch Stein	12,7	75,0 %	8,0 %	17,0 %
14. Verschl.extrahep.	7,6	88,0 %	0,0 %	20,0 %
15. Stauungsleber	9,0	75,0 %	20,0 %	5,0 %
16. Metastasenleber	25,0	75,0 %	13,0 %	12,0 %

Tabelle Nr. 6

Verteilung der Phosphataseaktivität auf die einzelnen Enzymfraktionen (I, II, III)

Komponenten	I	II	III
Zahl der Pat.	16		
Mittelwert $\bar{x}$	71,06	12,2	17,12
Standardabweichung s	9,38	5,74	8,30
Variationsk.	13	47	48

Abb. 7



4.12 KNOCHENERKRANKUNGEN

Für die Untersuchung standen Seren von 10 Patienten, die an Osteosarkom, Blasen-, Prostata-, Mamma- und Bronchialcarcinom mit ausgedehnter Knochenmetastasierung erkrankt waren, zur Verfügung.

Die alkalische Gesamtaktivität lag in einem Bereich von 16,2 bis 61,5 mME.

Alle untersuchten Phosphatasen ließen sich in eine oder drei Fraktionen auftrennen, wobei die I. Fraktion immer die höchste Enzymaktivität aufwies.

Von den 10 untersuchten Seren fanden sich bei 7 eine sehr breite Aktivitätszone (I) mit schneller Wandergeschwindigkeit. In 3 Fällen traten drei Banden auf, wobei die mittlere Zone (II) und die Zone an der Auftragstelle (III) eine nur sehr geringe Phosphataseaktivität zeigten.

Tab. Nr. 7 s. nächste Seite!

Tabelle Nr. 8

Verteilung der Phosphataseaktivität auf die einzelnen Enzymfraktionen (I, II, III)

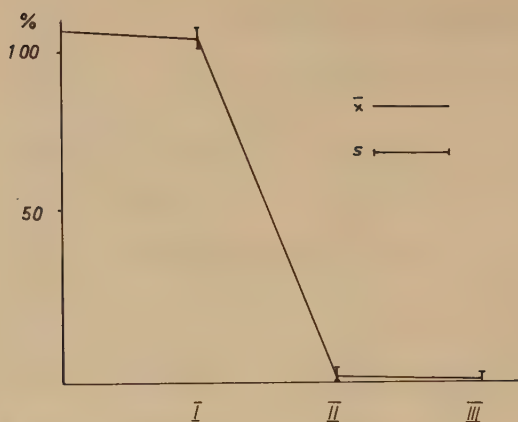
Komponenten	I	II	III
Zahl der Pat.	10		
Mittelwert $\bar{x}$	98,6	0,8	0,6
Standardabweichung s	2,44	1,3	2,0
Variationsk.	0,02	1,62	2,0

Tabelle Nr. 7

KNOCHENERKRANKUNGEN

Diagnose	AP mME	I	II	III
1. Osteosarkom	16,2	100,0 %	0,0 %	0,0 %
2. "	22,9	93,0 %	3,5 %	3,5 %
3. "	64,2	100,0 %	0,0 %	0,0 %
4. "	15,5	100,0 %	0,0 %	0,0 %
5. Kn-Metastasen	24,3	100,0 %	0,0 %	0,0 %
6. " "	26,5	97,0 %	3,0 %	0,0 %
7. " "	20,1	96,0 %	1,5 %	2,5 %
8. " "	20,9	100,0 %	0,0 %	0,0 %
9. " "	17,3	100,0 %	0,0 %	0,0 %
10. " "	16,5	100,0 %	0,0 %	0,0 %

Abb. Nr. 8



Da der Anteil der einzelnen Komponenten bei Patienten mit Hepatitis -Lebercirrhose einerseits und Cholangitis und Verschuß andererseits unterschiedlich groß war, wurde der Quotient aus Komponente I und Komponente II gebildet und überprüft, ob ein signifikanter Unterschied besteht.

Tabelle Nr. 9

I. Hepatitis - Cholangitis

Komponenten	I : II
χ^2	22,86
Signifikanz p	0,001

Tabelle Nr. 10

Hepatitis, Lebercirrhose -Verschluß

Komponenten	I : II
χ^2	19,21
Signifikanz p	0,001

Es wurde weiterhin überprüft, ob durch die Bildung eines Quotienten aus Komponente I: Komponente II + III eine signifikante Unterscheidung zwischen Leber - und Knochen-erkrankungen möglich ist.

Tabelle Nr. 11

Knochenerkrankungen - Hepatitis, Lebercirrhose

Komponenten	I : II + III
χ^2	11,96
Signifikanz p	0,001

Tabelle Nr. 12

Knochenerkrankungen - Cholangitis

Komponenten	I : II + III
χ^2	10,57
Signifikanz p	0,01

Wie aus den Tabellen Nr. 9, 10, 11 und 12 zu ersehen ist, findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen Hepatitis, Lebercirrhose, Cholangitis und Verschluß einerseits und Knochen- und Lebererkrankungen andererseits.

4.2 HITZEINAKTIVIERUNG

Untersucht wurden 20 Patienten mit Knochen- und hepatobiliären Erkrankungen, außerdem Galleflüssigkeit, die durch Duodenalsondierung von gesunden Studenten gewonnen wurde und Serum von gesunden Vergleichspersonen.

Daraus ergibt sich folgende Einteilung:

4.21 Hepatobiliäre Erkrankungen 10 Pat.

4 Patienten mit Cholangitis

2 Patienten mit Lebercirrhose

2 Patienten mit Hepatitis

2 Patienten mit Verschlußikterus

4.22 Knochenerkrankungen 10 Pat.

2 Patienten mit Osteosarkom

8 Patienten mit röntgenologisch gesicherten
Knochenmetastasen

4.23 Galleflüssigkeit 10 Stud.

4.24 Serum von gesunden Vergleichspersonen (Normalserum) 10 Pers.

Die Werte der alkalischen Phosphatase schwankten zwischen

6,41 mME	und	27,0 mME	in der Gruppe	4.21
10,2 mME	und	64,3 mME	" " "	4.22
9,60 mME	und	55,8 mME	" " "	4.23
0,70 mME	und	2,70 mME	" " "	4.24

4.21 Bei den Patienten mit Cholangitis, Hepatitis, Lebercirrhose und Verschlußikterus führte die Hitzeinaktivierung im Mittel zu einem Aktivitätsverlust von 65,19 % nach 10 min, von 89,74 % nach 15 min und von 93,41 % nach 30 min.

Die Restaktivität veranschaulicht die nächste Tabelle (Nr.13).

Tabelle Nr. 13

Zeit	10 min	15 min	30 min
Mittelwert d. PA nach Hitzein. in %	34,81	20,26	6,59
Standardabweichung	10,10	5,43	4,16
Variationskoeff.	29	26	63

4.22 Der Aktivitätsverlust in den Seren von Patienten mit Osteosarkom und Knochenmetastasen betrug nach 10 min 89,43 %, nach 15 min 95,28% und nach 30 min 99 %.

Die Restaktivität veranschaulicht die Tabelle Nr. 14.

Tabelle Nr. 14

Zeit	10 min	15 min	30 min
Mittelwert d. PA n. Hitzeinakt.in %	10,57	4,72	0,91
Standardabweichung	5,35	2,86	
Variationskoeff.	50	60	

- 4.23 Die Hitzeinaktivierung der Galleflüssigkeiten führte zu einem Aktivitätsverlust von 14,30 % nach 10 min, von 33,1 % nach 15 min und von 45,9 % nach 30 min.

Die Restaktivität veranschaulicht die Tabelle Nr. 15.

Tabelle Nr. 15

Zeit	10 min	15 min	30 min
Mittelwert d.AP n. Hitzeinakt.in %	85,70	66,10	54,10
Standardabweichung	5,41	10,88	11,36
Variationskoeffizient	6	16	20

- 4.24 Bei den Seren der gesunden Vergleichspersonen betrug der Aktivitätsverlust nach 10 min Hitzebehandlung 70,10 %, nach 15 min 83,70 % und nach 30 min 96,44 %.

Tabelle 16

Zeit	10 min	15 min	30 min
Mittelwert d. AP n. Hitzeinakt. in %	29,9	16,3	3,56
Standardabweichung	16,36	8,30	3,31
Variationskoeffizient	55	50	92

Tabelle Nr. 17

Inaktivierung der Serum-AP (in %) bei 56°C

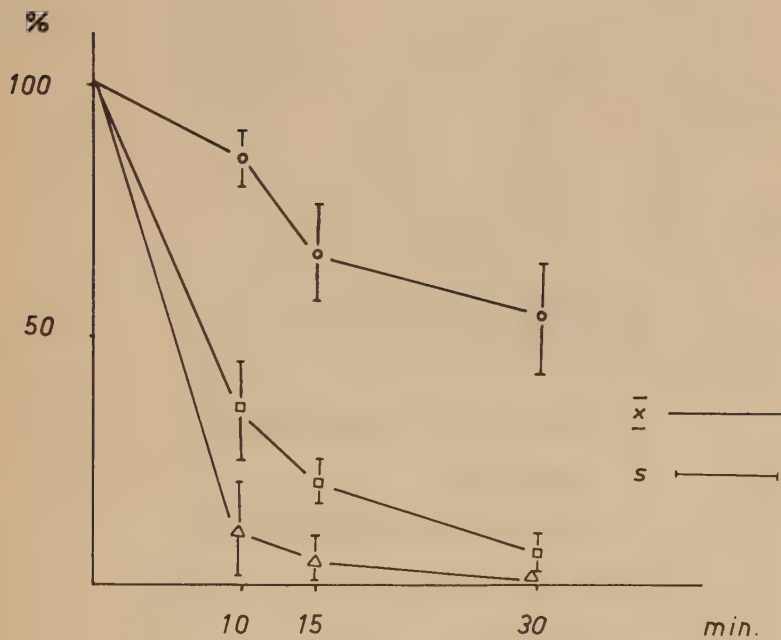
4.21 Leber

Zahl d. Pat.	AP mME = 100%	Diagnose	10 min	15 min	30 min
1	27,0	Colangitis	26,0 %	15,3%	3,5 %
2	17,4	"	49,0 %	29,0 %	12,0 %
3	10,2	"	36,5 %	21,6 %	3,0 %
4	25,2	"	28,8 %	17,4 %	2,4 %
5	18,3	Lebercirrhose	32,8 %	24,8 %	10,8 %
6	21,8	"	34,8 %	26,0 %	11,5 %
7	6,41	Hepatitis	35,0 %	22,0 %	11,0 %
8	16,8	"	24,7 %	12,5 %	3,75 %
9	21,8	Verschluß	25,5 %	14,1 %	2,7 %
10	25,0	"	55,0 %	19,9 %	5,3 %

4.22 Knochen

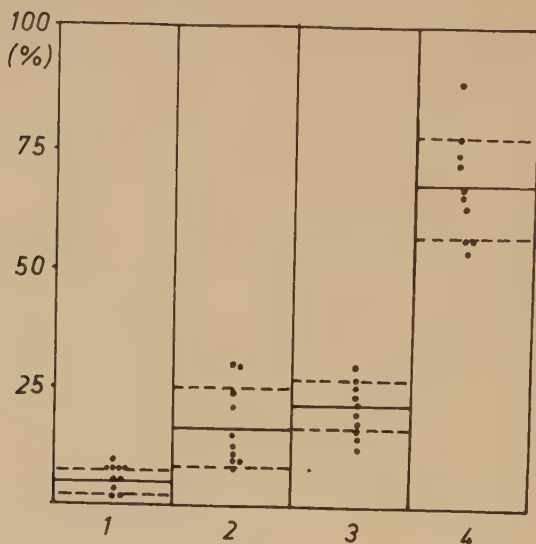
1	16,2	Osteosarkom	11,3 %	7,0 %	0,6 %
2	64,2	"	2,8 %	1,8 %	0,3 %
3	15,5	Knochenmetastasen	10,7 %	0,76 %	0,0 %
4	22,9	"	16,0 %	7,0 %	2,4 %
5	24,3	"	15,0 %	9,2 %	3,0 %
6	26,5	"	6,6 %	5,1 %	1,0 %
7	20,1	"	12,0 %	5,0 %	0,0 %
8	20,9	"	3,0 %	1,7 %	0,5 %
9	17,3	"	19,0 %	7,0 %	1,3 %
10	16,5	"	9,3 %	2,7 %	0,0 %

Mittelwerte und Standardabweichung nach
Hitzeinaktivierung bei 56°C
(Restaktivität in % des Ausgangswertes)



- GALLE - FLÜSSIGKEIT
- LEBER - SERUM
- △ KNOCHEN - SERUM

Hitzeinaktivierung der A P
nach 15 min bei 56 ° C



1. Serum v. Pat. mit Knochenkrankheiten
2. Normalserum
3. Serum v. Pat. mit Leberkrankheiten
4. Galle

$\bar{x}$ ——— s ———

Aus der Abbildung ist zu erkennen, daß die Streuungsbereiche der Seren von Knochen-, Leber- und Galle-Patienten deutlich voneinander getrennt liegen, während sich die Streuungsbereiche der Normal- und Leberseren weitgehend überlappen. Gleiche Verhältnisse ergeben sich bei der Hitzeinaktivierung nach 10 min.

Die Varianzanalysen (Tabellen Nr. 18, 19, 20, 21)
 ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen
 Knochen- und Leberphosphatase, wogegen jedoch die
 Hitzeinaktivierung der Ap in Normalseren und Seren
 Leberkranker keinen signifikanten Unterschied aufweist.

VARIANZANALYSE

Tabelle Nr. 18

Normalserum - Galleflüssigkeit

<u>Quelle</u>	<u>SS</u>	<u>df</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>
Zw. d. Pat.	25,25	19	1,32	
A	22,80	1	22,80	175,38 ⁺
Pat. innerh.	2,45	18	0,13	
Inn. d. Pat.	6,59	40	0,16	
B	6,03	2	3,01	301,0 ^{***}
AB	0,13	2	0,006	6,0 ⁺⁺⁺
B x Pat.	0,43	36	0,01	

(p = Signifikanz)

+ : p = 0,001

++ : p = 0,001

*** : p = 0,01

Tabelle Nr. 19Normalserum - Knochenserum

<u>Quelle</u>	<u>SS</u>	<u>df</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>
Zw. d. Pat.	3,62	19	0,19	
A	1,35	1	1,35	11,25 ⁺
Pat. innerh.	2,27	18	0,12	
Inn. d. Pat.	4,78	40	0,11	
B	3,85	2	1,91	382,0 ⁺⁺
AB	0,75	2	0,37	74,00 ⁺⁺⁺
B x Pat.	0,18	36	0,005	

+ : p = 0,01

++ : p = 0,001

+++ : p = 0,001

Tabelle Nr. 20Normalserum - Leberserum

<u>Quelle</u>	<u>SS</u>	<u>df</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>
Zw. d. Pat.	2,47	19	0,13	
A	0,28	1	0,28	2,23 ⁺
Pat. innerh.	2,19	18	0,12	
Inn. d. Pat.	6,67	40	0,16	
B	16,37	2	8,16	1168,5 ⁺⁺
AB	0,02	2	0,01	1,42 ⁺⁺⁺
B x Pat.	0,28	36	0,07	

+ : p = -

++ : p = 0,001

+++ : p = -

Tabelle Nr. 21Leberserum - Knochenserum

<u>Quelle</u>	<u>SS</u>	<u>df</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>
Zw. den Pat.	2,95	19	0,13	
A	1,68	1	1,68	24,0 ⁺
Pat. innerh.	1,27	18	0,07	
Inn. d. Pat.	4,59	40	0,101	
B	2,02	2	1,01	202,0 ⁺⁺
AB	1,84	2	0,92	148,0 ⁺⁺⁺
B x Pat.	0,18	36	0,005	

+ : p = 0,01

++ : p = 0,01

+++ : p = 0,01

4.3 HEMMUNG mit L - PHENYLALANIN

Da die Hemmung der alkalischen Phosphatase lediglich im Stärkegel erfolgte und auf das Filterpapier keine genau bestimmbare Menge aufgetragen werden konnte, wurde der Grad der Hemmung der Komponenten II und III mit dem Grad der Hemmung in der Komponente I, der nur sehr gering ist, in Beziehung gesetzt.

Bezeichnet man die Differenz der Komponenten I vor und nach der Hemmung mit 1, so ist aus den Zahlen, die die Differenz der anderen Komponenten angeben zu ersehen, wie stark im Verhältnis zur Komponente I die Hemmung erfolgte.

Die nächste Tabelle gibt die errechneten Werte wieder:

Tabelle Nr. 23

Diagnose	I	II	III
Verschlußikterus	1	0,25	0,66
"	1	22,5	2,20
"	1	0,90	48,4
"	1	2,20	5,0
"	1	2,0	12,0
Cholangitis	1	60,7	73,8
"	1	1,2	0,47
"	1	10,6	5,33
Akute Hepatitis	1	6,5	80,6
"	1	2,0	0,2
"	1	2,9	16,4
"	1	85,0	20,0
Chron. Hepatitis	1	1,1	1,3
"	1	6,0	166
Lebercirrhose	1	1,5	-
"	1	4,0	9,2
"	1	90,0	60,0
"	1	115,5	48,8
"	1	1,0	2,8
"	1	157,5	20,16
"	1	65,0	15,0
"	1	0,8	12,7
"	1	2,0	4,0
Prim. Lebertu.	1	3,0	40,0
Stauungsleber	1	1,0	0,3
"	1	8,3	3,3
Plasmocytom	1	23,5	52,9
Osteosarkom	1	35,0	35,0
Melanom	1	0,8	4,3

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist die Hemmung der Komponenten II und III in den meisten Seren deutlich stärker als in Komponente I. Lediglich bei 2 Patienten wurden sowohl Komponente II als auch III weniger stark gehemmt als I, und in zwei weiteren Fällen war nur in der Komponente II eine geringere Hemmung zu verzeichnen.

Die Intensität der Hemmung bei den verschiedenen Lebererkrankungen weist große Schwankungen auf. In der Komponente II konnte eine bis zu 157 fach stärkere Hemmung und in der Komponente III eine bis zu 166fach stärkere Hemmung, bezogen auf die Komponente I, beobachtet werden.

Die stärkste Hemmung konnte in den Seren von Patienten mit Lebercirrhose gefunden werden.

Die Schwankungen waren so groß, daß eine Unterscheidung verschiedener Gruppen von Lebererkrankungen, z.B. Verschlußikterus, Hepatitis, Lebercirrhose, nicht erfolgen kann.

5.0 D I S K U S S I O N

5.1 STÄRKEGELELEKTROPHORESE

Die von uns durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß mittels der elektrophoretischen Auftrennung der alkalischen Phosphatasen im Stärkegel eine Unterscheidung zwischen Leber- und Knochenkrankungen

und zwischen den Pherogrammen von Patienten mit Hepatitis oder Cirrhose und von Patienten mit Cholangitis oder Verschlußikterus möglich ist. Die von uns gefundenen Ergebnisse stimmen weitgehend mit den in der Literatur angegebenen überein.

Wie HODSON et al, KOTZAUREK und SCHOBEL, CHIANDUSSI et al fanden auch wir, je nachdem ob das Serum von einer gesunden Versuchsperson oder von Patienten mit verschiedenen Leber- und Knochenerkrankungen stammte, ein bis drei Fraktionen. Ein Unterschied zeigte sich lediglich bei extrahepatischem Verschluß, bei dem wir nur zwei Komponenten beobachteten, während die Gruppe CHIANDUSSI, GREEN und SHERLOCK vier Banden fanden.

TASWELL und JEFFERS fanden in der Stärkegelelektrophorese bis zu acht Fraktionen, wobei sie wie wir drei charakteristische Enzymmuster beobachteten, von denen das eine dem Bild des Verschlußikterus, das zweite dem des Parenchymikterus und das dritte einer gesteigerten Osteoblastentätigkeit entsprach.

WARNOCK und NEWTON konnten insgesamt sieben Fraktionen der alkalischen Phosphatase nachweisen.

Zu dem gleichen Ergebnis wie wir kamen auch HILL und SAMMONS, sie fanden bei Verschlußikterus stets eine Erhöhung der Aktivität im Bereich der β -Globuline sowie eine deutliche Aktivität an der Auftragstelle und eine geringere im β -Lipoproteinbereich. Bei Seren mit erhöhter alkalischer Phosphatase lag der

Hauptgipfel der Aktivität im β -Globulinbereich, ein kleiner Gipfel im Bereich der β -Lipoproteine.

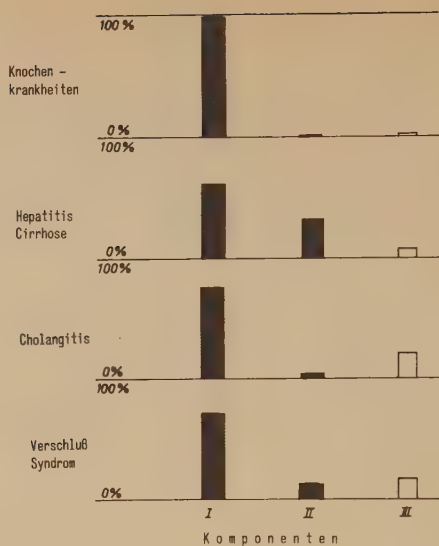
TASWELL und Mitarbeiter beobachteten bei gesteigerter Osteoblastentätigkeit neben einer Zone im β -Lipoproteinbereich noch eine zusätzliche Zone im Startbereich.

Wir fanden bei sieben von zehn Patienten mit Knochen-erkrankungen lediglich eine Komponente. Drei Patienten wiesen drei Komponenten auf, wobei jedoch zu erwähnen ist, daß die Banden II und/oder III nur sehr geringe Aktivität aufwiesen.

Bei den verschiedenen Gruppen von Lebererkrankungen fanden sich häufig charakteristische Pherogramme. Eine sichere Unterscheidung zwischen den einzelnen Gruppen ist jedoch nur möglich zwischen Hepatitis und Cholangitis. Allerdings sind die Pherogramme von Patienten mit Hepatitis von den Pherogrammen der Patienten mit Lebercirrhose nicht zu unterscheiden. Ebenfalls ist eine sichere Unterscheidung im Verteilungsmuster der alkalischen Serumphosphatasen zwischen Knochen- und Lebererkrankungen möglich.

Die nächste Abbildung zeigt graphisch die verschiedenen charakteristischen Typen (Mittelwerte in %).

Abb. 11



5.2 HITZEINAKTIVIERUNG

Tabelle Nr. 23

Mittelwerte der AP nach Hitzeinaktivierung
bei 56°C

Zeit	Leber-S	Normal-S.	Knochen-S	Galle
min	%	%	%	%
0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	34,81	29,9	10,57	85,7
15	20,26	16,30	4,72	66,1
30	6,59	3,56	0,91	54,1

Wie die Tabelle Nr. 23 zeigt, ist sowohl nach 10 min als auch nach 15 und 30 min ein deutlicher Unterschied in der Hemmbarkeit festzustellen.

Eine Unterscheidung von Normalseren und Seren Leberkranker konnten wir mittels dieser Methode nicht

erzielen. Im Gegensatz dazu konnte POSEN neben der Unterscheidung zwischen Leber- und Knochenphosphatase auch einen signifikanten Unterschied zwischen Normalserum und Seren Leberkranker finden.

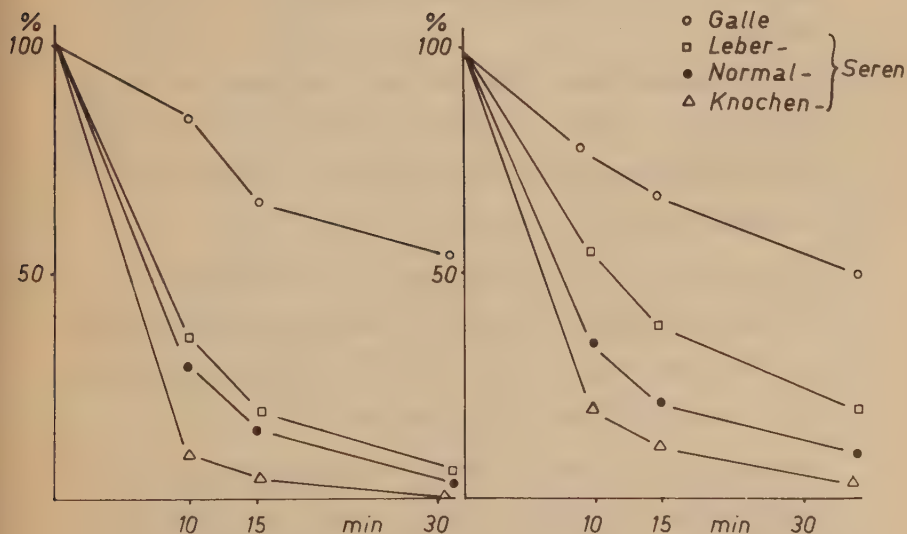
Auffallend war, daß - obwohl die gleiche Methode angewandt wurde, die von uns gemessenen Aktivitätsverluste größer waren als die von POSEN.

Einen Vergleich beider Ergebnisse zeigt die nächste Abbildung.

Abb. Nr. 12 Hitzeinaktivierung d. AP bei 56°C

A: Eigene Ergebnisse

B: POSEN 1965



Aus Untersuchungen des Arbeitskreises FISHMAN (1963, 1965) ist bekannt, daß die intestinale alkalische Phosphatase im Gegensatz zu der von Galle, Knochen, Leber, Lunge, Niere und Milz bis zu 78% durch L-Phenylalanin gehemmt werden kann. Unsere Untersuchungen bei Patienten mit Lebererkrankungen zeigten, daß mittels L-Phenylalanin hauptsächlich die Komponenten II und III gehemmt werden konnten. Daraus ist zu entnehmen, daß auch bei Lebererkrankungen die intestinale alkalische Phosphatase mit erhöht ist.

Die Hemmung der Komponenten II und III war sehr verschieden groß und erreichte in der Komponente II eine bis zu 157fach stärkere und in der Komponente III eine bis zu 166fach stärkere Hemmung bezogen auf die Komponente I.

Eine Unterscheidung verschiedener Gruppen von Lebererkrankungen konnte mit dieser Methode nicht erfolgen. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von FISHMAN, INGLIS und GRANT überein.

Vergleicht man die Aussagekraft der drei Methoden, so ist zu sagen, daß mittels der Stärkegelelektrophorese eine sichere Unterscheidung zwischen Erkrankungen der Leber und des Knochens möglich ist.

Auch läßt diese Methode eine Differenzierung zwischen parenchymatösem Ikterus (akute Hepatitis, chronische Hepatitis, Lebercirrhose) einerseits und Verschlußikterus andererseits zu.

Recht eindeutige Ergebnisse erzielt man mit der Hitzeinaktivierung, jedoch bezieht sich diese Aussage nur auf die Unterscheidung zwischen Leber- und Knochen-AP.

Die Hemmuntersuchung mit L- Phenylalanin konnte nicht zu einer Differenzierung der Knochen- und Leber-AP beitragen.

6.0

ZUSAMMENFASSUNG

Die alkalische Phosphatase, ein isodynames Enzym, kann mittels der Stärkegelelektrophorese in mehrere Komponenten aufgetrennt werden.

Da die alkalische Phosphatase hauptsächlich in der Leber, Galle, Knochen, Darm, Niere und Milz gefunden wird und die Pherogramme der einzelnen Organphosphatasen verschieden sind, wurde sie zu differentialdiagnostischen Erwägungen herangezogen.

Die von den einzelnen Autoren erzielten Ergebnisse sind jedoch widersprechend.

Eine weitere Unterscheidung der alkalischen Phosphatasen ist mittels der von POSEN entwickelten Hitzeinaktivierung möglich.

Auch kann mittels der Hemmung mit L-Phenylalanin die Darmphosphatase von anderen Organphosphatasen wie Leber, Galle, Knochen u.a. unterschieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Methode für differentialdiagnostische Untersuchungen am geeignetsten erscheint. Es zeigte sich dabei, daß die alkalische Phosphatase mittels der hochspannungselektrophoretischen Auftrennung im Stärke-gel meistens

in drei Komponenten aufgetrennt werden konnte. Ein signifikanter Unterschied fand sich zwischen den Pherogrammen aus Seren von Leber- und knochenkranken Patienten. Verschiedene Gruppen von Lebererkrankungen zeigten z.T. charakteristische Enzymmuster, so daß innerhalb der Gruppen parenchymatöser Ikterus - Verschußikterus eine Aussage möglich war.

Mittels der Inaktivierung der alkalischen Phosphatasen bei 56°C konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Knochen- und Leberphosphatase festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied der AP bei Patienten mit Lebererkrankungen und der von gesunden Personen bestand nicht.

Bei der Hemmung mit L - Phenylalanin, das die Darmphosphatase inaktiviert, konnten hauptsächlich die Komponenten II und III gehemmt werden. Da diese Komponenten auch bei Lebererkrankungen auftreten, ist eine Zunahme der Darmphosphatase bei Lebererkrankungen sehr wahrscheinlich.

Eine Unterscheidung zwischen Leber- und Knochenphosphatase ist mit dieser Methode nicht möglich.

Vergleicht man die beiden ersten Methoden hinsichtlich ihrer differentialdiagnostischen Aussagekraft, so besteht wohl kein wesentlicher Unterschied.

Beide sind bei differentialdiagnostischen Erwägungen bedeutsam.

7.0 L i t e r a t u r

1. Aebi, H. und Richterich, R.: Aktuelles zur Biologie der Enzyme
Helv. med. Acta 30, (1963)
2. Boyer, S. H.: Alkaline Phosphatases in human sera and placenta
Science 134, (1961)
3. Chiandussi, L.; S. F. Greene; S. Sherlock: Serum alkaline phosphatase fractions in hepato-biliary and bone disease
Clin. Sci. 22, 425 (1962)
4. Dunne, J.; J. J. Fennelly; K. McGeeney: Separation of alkaline phosphatase enzymes in human serum using gel-filtration (sephadex G - 200) techniques
Cancer 20, 71 (1967)
5. Estborn, B.: Separation of isoenzymes by gel-filtration
Z. klin. Chem. 2, 1636 (1964)
6. Fishman, W. H.; G. H. Kreisher: Stereospecific, organ-specific inhibition of intestinal alkaline phosphatase
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 951 (1963)
7. Fishman, W. H.; S. Green; N. I. Inglis: L-Phenylalanine: An organ-specific, stereospecific inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase.
Nature (London) 198, 685 (1963)
8. Fishman, W. H.; N. J. Inglis; M. J. Krant: Serum alkaline phosphatase of intestinal origin in patients with cancer and with cirrhosis of liver.
Clin. chim. Acta (Amsterdam) 12, 298-303 (1965)
9. Haije, W. G.; Jong, M. De: Isoenzyme patterns of serum alkaline phosphatase in agar-gel electrophoresis and their clinical significance.
Clin. chim. Acta 8, 620 (1963)
10. Hodson, A. W.; A. L. Latner; L. Raine: Isoenzymes of alkaline phosphatase
Clin. chim. Acta 7, 255 (1962)
11. Hill, P. G. and H. G. Sammons: An interpretation of the elevation of serum alkaline phosphatase in disease.
J. clin. Pathn. 20, 654 - 659 (1967)

12. Keiding, N.R.: Differentiation into three fractions of serum alkaline phosphatase and the behavior of the fractions in diseases of bone and liver.
Scand. J.Clin. Lab. Invest. 11, 106 (1959)
13. Kotzaurek, R.; B. Schobel: Das Verhalten der alkalischen Phosphataseaktivität im menschlichen Serum bei Skelett- und Leber-Gallenwegs-Erkrankungen.
Klin. Wschr. 41, 956-961 (1963)
14. Kreisher, J.H.; V.A. Close; W.H. Fishman: Identification by means of L - Phenylalanine inhibition of intestinal alkaline phosphatase components separated by starch gel electrophoresis of serum
Clin. chim. Acta (Amsterdam) 11, 122-127 (1965)
15. Lienert, G.A.: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.
Meisenheim, 1962
16. Moos, D.W.; E.J. King: Properties of alkaline phosphatase fractions separated by starch-gel-electrophoresis.
Biochem. J. 84, 192 (1962)
17. Nordentoft-Jensen, B.: Behavior of the fractions of serum alkaline phosphatase in the course of diseases of liver or bone.
Acta med. scand. 176, 705-710 (1964)
18. Newton, M.A.: The clinical application of alkaline phosphatase electrophoresis
Quart. J.M. 36, 17 (1967)
19. Posen, S.: Alkaline Phosphatase
Ann. of Int. Medic. 67, 183-203 (1967)
20. Pfeleiderer, G.: Neuere Untersuchungen über Isoenzyme.
Vortrag: Biochem. Kolloquium Gießen 1966.
21. Posen, S.; Neale, F.C.; J.S. Clubb: Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases.
Int.Med. 62 81-86 (1965)
22. Suzuki, U.; K. Yoshimura; M. Takaishi: Über ein Enzym "Phytase" das Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure spaltet.
Bull.Coll. Agriculture, Tokyo Imp. Univ. 7, 503 (1907).

23. Smithies: Zone electrophoresis in starch gels:
Group variations in the serum proteins of
normal proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61, 629-641 (1955)
24. Taswell, H.G.; D.M. Jeffers: Isoenzymes of serum alkaline
phosphatase in hepatobiliary und skeletal
disease.
Amer. J. clin. Path. 40, 349 (1963)
25. Wieland, Th. und G. Pfeleiderer: Differenten und multiple
Formen von Enzymen.
Angew. Chemie 74, (1962)
26. Wieland, Th. und G. Pfeleiderer: Multiple Formen von En-
zymen.
Advances in Enzymology Vol. XXV 329-368
Interscience New York - London 1963
27. Warnock, M.L.: Characterisation of tissue and serum
alkaline phosphatases.
Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 14, 156-165
(1966)
28. Winer, B.J.: Statistical Principles in Experimentelle
Design, 1962
29. Gosh, N.K.; Fishman, W.H.: On the mechanism of inhibi-
tion of intestinal alkaline phosphatase
by L-Phenylalanine. I. Kinetic studies
J. Biol. Chem. 241, (1966).

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Wörner danke ich für die Überlassung des Themas, für seine freundliche und stets bereitwillig gewährte Unterstützung und für das Referat zu dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Löffler möchte ich für die zahlreichen Ratschläge und Frau Trinkaus für die wertvolle technische Mitarbeit danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Gießen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel "Untersuchung über die diagnostische Bedeutung von Auftrennungsmethoden der alkalischen Phosphatase" in der Medizinischen Universitätsklinik Gießen unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. W. Wörner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher weder von einer inländischen noch ausländischen Fakultät ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Gießen, den 15. April 1969.

Jus Wolff

L e b e n s l a u f

Am 16.10.1941 wurde ich als Tochter des Arztes
Dr. med. Adolf Wolff und seiner Ehefrau Ria Wolff
geb. Heinbuch in Schlüchtern geboren.

Im Herbst 1948 erfolgte die Einschulung in Sterbfritz.
Nach vier Jahren bestand ich die Aufnahmeprüfung zur
Sexta und legte am 24.2.1962 an der Winfried-Schule in
Fulda die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich an
der Justus-Liebig-Universität Gießen, wo ich am
17.10.1964 das Physikum und am 26.2.1968 das medizinische
Staatsexamen bestand.

Gießen, den 15. April 1969.

lin Wolff

